



Title	A Study on a Novel Lipase Hydrolyzing t-Butyl Esters
Author(s)	呂, 淳煥
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41453
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	呂珠煥
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第14603号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科酵工学専攻
学位論文名	A Study on a Novel Lipase Hydrolyzing <i>t</i> -Butyl Esters (<i>t</i> -ブチルエステル加水分解能を有する新規リバーゼに関する研究。)
論文審査委員	(主査) 教授 山田 靖宙
	(副査) 教授 菅 健一 教授 ト部 格 教授 室岡 義勝

論文内容の要旨

有機合成反応に酵素を応用するプロセスは、この10数年来盛んに研究され、特にリバーゼの応用は非水溶媒系中の反応を中心に顕著な発展を見ている。現在では既存の市販リバーゼとは異なる、新規活性を持つリバーゼの開発が要求されている。本学位論文は、新規リバーゼを得る手段の一つとして、既存のリバーゼでは難加水分解性である立体障害の大きい3級アルコールのエステルを加水分解しうるリバーゼ生産菌を土壤から分離し、その性質を検討した成果をまとめた物である。論文は4章からなり、第1章では、リバーゼの応用例に関する知見をまとめ、本論文の歴史的背景について述べている。

第2章では、エステル部位に立体障害の大きい3級アルコールエステルであるTBO (*t*-butyl octanoate) を单一炭素源として生育、加水分解する新規微生物YY62株の分離、同定、培養方法、産生リバーゼについて述べている。休止菌体を用いてTBO加水分解の経時変化を検討し、生産物としてオクタン酸が経時的に増加することを確認し、YY62株がTBO加水分解酵素を持つことを確認している。次にYY62株の菌学的同定を行い、形態観察、グラム染色、好気性、運動性、ユビキノン分子種の同定、GC含量の決定、16SrRNAの部分塩基配列決定を行い、*Burkholderia* sp.と同定している。また、本リバーゼの生産最適培養条件を決定している。本酵素の性質に関しては、*t*-ブチルエステル加水分解能が市販の4種類のリバーゼに対して100倍以上あること及び基質のアシル基の長さに応じて反応性が変化していることを指摘している。

第3章では、*Burkholderia* sp. YY62株の生産するリバーゼの精製過程、酵素的性質について述べている。YY62株は少なくとも2種類のエステル加水分解酵素を生産していることを見出し、YY62株菌体より各種クロマトグラフィーによる7段階の精製を行い、精製操作を確立している。次に本リバーゼの分子量を変性、未変性状態とともに約40kDaと決定し、モノマー酵素であることを指摘している。本酵素反応における2価金属、その他の付加物の活性の及ぼす効果を調べ、その依存性がないことを明らかにしている。また、精製リバーゼのN末端から15個のアミノ酸配列を決定し既知のリバーゼのアミノ酸配列と比較している。

第4章では、研究成果を総括し、本酵素の応用に関する展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

リバーゼは一般に基質特異性が広く、粗精製状態では溶媒中でも安定であるため、光学分割、官能基、位置特異的反応、脂質の改良、洗剤等に幅広く利用されており、さらに新規反応を触媒出来るリバーゼが要求されている。本論文では現在ほとんど知られていない難加水分解性3級アルコールエステル加水分解能を有するリバーゼを検索するためTBOを用いて天然からその分解能のあるリバーゼを探査、精製した結果を記述したものであり、主な成果は次の通りである。

- (1) 自然環境の土壤よりTBOを单一炭素源とする微生物を279種分離し、22種の有望なTBO分解菌を見出している。また、簡便なTBO分解能検出法を考案している。
- (2) 上記22種中の微生物より、TBO分解能の優れたYY62株を選び、そのTBO加水分解能を確認し、詳細な菌学的同定の結果、*Burkholderia* sp.と同定している。
- (3) 本リバーゼ生産最適培養条件を決定し、本リバーゼが市販リバーゼの100倍以上のTBO加水分解活性を持っていることを明らかにしている。
- (4) 本リバーゼの基質特異性を検討し、*t*-ブチルエステルにおいてはアシル基の長さに活性が依存し、オクチル基が最適鎖長であることを指摘している。
- (5) 細胞内酵素であるTBO加水分解能を有するリバーゼの精製法を確立し、その分子量を40 kDaと決定している。
- (6) 本リバーゼ活性に対する2価金属の影響を調べ、その依存性活性増加が無いこと、及びSer型の酵素である可能性を示している。また、N末端より15残基のアミノ酸配列を決定している。

以上のように本論文は、立体障害の大きい、酵素による難加水分解性3級エステル加水分解能を有する新規リバーゼの天然よりの探索、同定、精製法、性質を明らかにしており、醸酵工学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。